

Rec'd PCT/PTO 28 DEC 2004

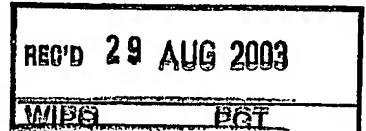
PCT/JP03/08244
10/519559
12.08.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 6 月 2 7 日
Date of Application:



出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 8 3 8 6 3
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 8 3 8 6 3]

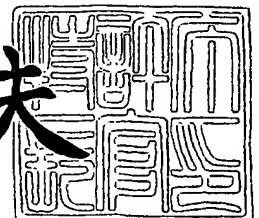
出 願 人 科学技術振興事業団
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 8 月 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 6 2 7 7 (

【書類名】 特許願
【整理番号】 P023P10
【提出日】 平成15年 6月27日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 48/00
A61K 9/51
A61K 47/42
A61P 35/00
A61P 43/00
C07K 14/02
C07K 19/00

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市上山田 7 番 C - 1 0 4 号

【氏名】 黒田 俊一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊能郡豊能町希望ヶ丘 2 - 3 0 - 2

【氏名】 谷澤 克行

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区篠原伯母野山町 1 - 2 - 8 0 6

【氏名】 近藤 昭彦

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区納戸町 6

【氏名】 上田 政和

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市門田文化町 2 - 1 0 - 1 3

【氏名】 妹尾 昌治

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市伊島町 2 - 2 0 - 2 2 - 2 0 6

【氏名】 多田 宏子

【特許出願人】

【識別番号】 396020800
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100080034
【弁理士】
【氏名又は名称】 原 謙三
【電話番号】 06-6351-4384

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-191386
【出願日】 平成14年 6月28日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003229
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0111475

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 システイン残基を改変したタンパク質からなる中空ナノ粒子およびそれを用いた薬剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

特定の細胞に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子において、当該タンパク質に含まれる少なくとも 1 つのシステイン残基が改変されてなる中空ナノ粒子。

【請求項 2】

上記タンパク質は、B 型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質である請求項 1 記載の中空ナノ粒子。

【請求項 3】

膜貫通領域に存在する少なくとも 1 つのシステイン残基が疎水性アミノ酸に置換され、及び／又は、粒子外部または内部に存在する少なくとも 1 つのシステイン残基が親水性アミノ酸に置換されている請求項 1 または 2 記載の中空ナノ粒子。

【請求項 4】

膜貫通領域に存在する少なくとも 1 つのシステイン残基がアラニン残基に置換され、及び／又は、粒子外部または内部に存在する少なくとも 1 つのシステイン残基がセリン残基に置換されている請求項 3 記載の中空ナノ粒子。

【請求項 5】

上記 B 型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質の、S タンパク質アミノ酸配列における N 末端部分から数えて 76, 90, 139, 147, 149, 221 番目のシステイン残基が置換され、かつ、137, 138 番目のシステイン残基から選ばれる少なくとも 1 つが置換されている請求項 2 ～ 4 の何れか 1 項に記載の中空ナノ粒子。

【請求項 6】

上記システイン残基の改変は、上記粒子形成能を有するタンパク質をコードする遺伝子に変異を導入し、この変異遺伝子を発現させることにより行われることを特徴とする請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載の中空ナノ粒子。

【請求項 7】

上記変異遺伝子を含むベクターにて真核細胞を形質転換させ、当該真核細胞において上記変異遺伝子を発現させることにより得られることを特徴とする請求項 6 記載の中空ナノ粒子。

【請求項 8】

上記真核細胞は、動物細胞または酵母であることを特徴とする請求項 7 記載の中空ナノ粒子。

【請求項 9】

請求項 1～8 の何れか 1 項に記載の中空ナノ粒子に細胞導入物質が封入されていることを特徴とする薬剤。

【請求項 10】

上記細胞導入物質は、遺伝子であることを特徴とする請求項 9 記載の薬剤。

【請求項 11】

請求項 9 または 10 に記載の薬剤を用いる疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、疾患治療用の細胞導入物質を封入することができる中空ナノ粒子に関し、より詳細には、粒子内部に封入された疾患治療用の細胞導入物質を特定細胞または組織内に特異的に導入可能な薬剤に関するものである。

【0002】**【従来の技術】**

近年、医学の分野において、患部に直接作用し、高い効果を示す副作用の少ない薬品の開発が盛んに行われている。特に、ドラッグデリバリーシステム（DDS）と呼ばれる方法は、目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的に薬剤等の有効成分を運搬し、目的箇所では有効成分を作用させることのできる方法として注目されている。

【0003】

目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的に薬剤となるタンパク質を送り

込む方法としては、従来、当該タンパク質をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターをエレクトロポレーション法等により目的細胞に導入して、この遺伝子を細胞内で発現させることによりタンパク質薬剤を細胞内に送り込むいわゆる遺伝子導入方法が開発されてきた。しかし、このような従来の遺伝子導入方法では、何れも、目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的にタンパク質薬剤を送り込む方法としては不十分なものであった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

以上のような状況に鑑み、本発明者らは、国際公開番号WO01/64930の国際出願（以下、「国際出願WO01/64930」という）において、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入された中空ナノ粒子を用いて、目的とする細胞や組織に、物質（遺伝子、タンパク質、化合物等）を特異的かつ安全に運搬、導入するための方法を提案しているが、この方法を応用しつつ目的の細胞または組織に対して物質をより効率的に導入するためのさらなる改良が課題となっていた。

【0005】

本発明は、上記の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、目的の細胞や組織に特異的に効率よく物質を導入するタンパク質中空ナノ粒子、およびこの中空ナノ粒子に細胞導入物質を包含させた薬剤を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、粒子を形成するタンパク質のシステイン残基を改変することにより、粒子による物質の細胞特異的導入効率が飛躍的に高まることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0007】

即ち、本発明に係る中空ナノ粒子は、特定の細胞（例えば肝細胞など）に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子において、当該タンパク質におけるシステイン残基を改変した中空ナノ粒子である。

【0008】

上記「粒子形成能を有するタンパク質」としては、例えばB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を挙げることができる。このタンパク質は、真核細胞で発現させると、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出される。本発明の中空ナノ粒子は、このような粒子形成能を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むベクターによって真核細胞（例えば哺乳類等の動物細胞または酵母）を形質転換させ、当該真核細胞に遺伝子発現させることにより製造することができる。

【0009】

上記B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を用いて形成された粒子は、肝細胞を認識し、肝細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができるので、肝臓疾患治療用の物質（遺伝子等）を包含させることにより、肝細胞に対して特異的かつ効果的に作用する有効な治療薬となる。

【0010】

また、例えば上記B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を、本来の肝細胞に対する感染能を欠失するように改変し、さらに増殖因子や抗体を提示するように改変し、このように改変されたB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を用いて粒子を形成することで、肝細胞以外の特定の細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができる。例えば、ある癌細胞を特異的に認識する抗体を提示させることで、その癌細胞を認識し、その癌細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができる。

【0011】

上記B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質における後述のSタンパク質は、タンパク質の酸化還元に関与するシステイン（Cys）残基を合計14個有している。これらのCys残基は形成された粒子の構造を制御していると考えられるが、粒子の精製過程あるいは保存中にCys残基同士の過剰なジスルフィド結合により、タンパク質の分子間および分子内に不規則なジスルフィド架橋が生じてポリマー化し安定性に欠ける。そこで、これらCys残基のうち上記構造の制御に重要でないものを改変することによって（あるいは、これらCys残基以外で粒子形成能や細胞認識能に実質的な影響を与えないCys残基を改変することによって）ポリマ

一化を防ぎ、これにより、粒子に安定性が付与され、また、中空ナノ粒子への物質の封入効率が向上するので、包含する物質を効率よく細胞に導入することができる。

【0012】

具体的には、B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を例に挙げると、Sタンパク質アミノ酸配列におけるN末端部分から数えて76, 90, 139, 147, 149, 221番目のシステイン残基を置換し、かつ、137, 138番目のシステイン残基から選ばれる少なくとも1つを置換するのが好ましい。

【0013】

Cys残基の改変は、他のアミノ酸への置換が好ましいが、Cys残基を欠失させるような改変を行ってもよい。B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質は膜貫通型の膜タンパク質であるので、粒子外、脂質二重層膜内部および粒子内の各部にまたがって存在するが、Cys残基を置換するアミノ酸は、脂質二重層膜内部に存在すると予測されるCys残基は疎水性のアミノ酸（例えばアラニン（Ala）残基）に、粒子外部および内部に存在すると予測されるCys残基は親水性のアミノ酸（例えばセリン（Ser）残基）に置換するのが好ましい。

【0014】

システイン残基の改変は、上記粒子形成能を有するタンパク質をコードする遺伝子に変異を導入し、例えば、変異遺伝子を含むベクターにて真核細胞を形質転換させ、当該真核細胞において上記変異遺伝子を発現させる等の方法で改変された中空ナノ粒子を作製することができる。

【0015】

また、本発明の中空ナノ粒子に治療物質を包含させた薬剤では、静脈注射という簡便な方法で特定の細胞または組織における疾患を効果的に治療することができる、従来の治療方法と大きく異なり、多量の薬剤の投与や遺伝子治療等における外科手術を必要とせず、副作用の心配も極めて低く、そのまま臨床応用可能なものである。

【0016】

本発明の治療方法は、本発明の薬剤を投与することによる疾患の治療方法であ

る。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明の中空ナノ粒子は、粒子形成能を有するタンパク質のシステイン残基を改変してなるものであるが、その粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子（換言すれば、特定の細胞を認識する分子）を導入することによって、目的細胞あるいは目的組織に特異的に物質を運搬することができる。このような粒子形成能を有するタンパク質としては、種々のウイルスから得られるサブウイルス粒子を適用することができる。具体的には、B型肝炎ウイルス（Hepatitis B Virus: HBV）表面抗原タンパク質等が例示される（以下、このB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を「HBsAg」と略記する場合がある）。

【0018】

また、このような粒子形成能を有するタンパク質からなるタンパク質粒子としては、真核細胞でタンパク質を発現させることにより得られるものが挙げられる。つまり、真核細胞で粒子形成能を有するタンパク質を発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出されるのである。このとき、真核細胞としては、哺乳類等の動物細胞、酵母等が適用できる。

【0019】

本発明者らは、遺伝子組換え酵母で上記HBsAgのLタンパク質（後述の実施例参照）を発現させることにより、発現されたHBsAgのLタンパク質から酵母由来の脂質二重膜に多数の同タンパク質が埋め込まれた短径約20nm、長径約150nmの楕円状中空粒子が形成されることを見出し、報告している（J. Biol. Chem., Vol.267, No.3, 1953-1961, 1992）。このような粒子は、HBVゲノムを全く含まないので、ウイルスとしては機能せず、人体への安全性が極めて高い。また、HBVの肝細胞への極めて高い感染力を担う肝細胞特異的レセプターを粒子表面に提示しているため、肝細胞に対して特異的に物質を運搬する運搬体としての効果も高いのである。

【0020】

このように遺伝子組換え酵母を用いてタンパク質粒子を形成する方法は、菌体内の可溶性タンパク質から高効率で粒子が生産される点で好適である。

【0021】

上記HBsAgのSタンパク質（後述の実施例参照）は、タンパク質の酸化還元に関与するシステイン（Cys）残基を合計14個有している。これらのCys残基は形成された粒子の構造を制御していると考えられるが、粒子の精製過程あるいは保存中にCys残基同士の過剰なジスルフィド結合によりポリマー化し安定性に欠ける。そこで、これらCys残基のうち上記構造の制御に重要でないものを改変することによって、粒子に安定性を付与して保存を容易にし、また、中空ナノ粒子への物質の封入効率が向上するので、包含する物質を効率よく細胞に導入することができる。

【0022】

改変されるCys残基の部位は特に限定されるものではないが、HBsAg粒子の機能を損なわないように改変する必要がある。HBsAgのLタンパク質は肝細胞認識部位であるPreS1やPreS2と、Sタンパク質とからなるが、Sタンパク質においてはアミノ酸を改変してもHBsAg粒子の機能への影響が少ないと考えられる。そこで、Sタンパク質に含まれているシステイン（Cys）残基14個（図1の模式図中に「C」でその位置が示されている）の一部を改変することによって、HBsAg粒子がその肝細胞認識能や粒子形成能を失わずにジスルフィド結合を解くことができると考えられる。

【0023】

Sタンパク質に含まれる14個のCys残基は、Sタンパク質のアミノ酸配列のN末端部分から数えて、48, 65, 69, 76, 90, 107, 121, 124, 137, 138, 139, 147, 149, 221番目に位置する（図2下線部）。図1の模式図に示すとおり、HBsAgタンパク質は膜貫通タンパク質であり、N末端側のPreS領域が粒子外部にあり、それに続くSタンパク質部分では膜を貫通して粒子内部へ入った後、再び膜を貫通して粒子外部に出、もう一度膜に入ってC末端部分は膜内に留まっている。つまり、Sタンパク質は、3つの膜貫通部位と粒子内部分と粒子外に露出した部分からなる。上述した14個のCys残基は、48, 65, 69番目が粒子内に存在し、76, 90, 107番目が第2の

膜貫通領域に位置し、121, 124, 137, 138, 139, 147番目が粒子外部に露出し、149, 221番目が第3の膜貫通部位に位置すると予測されている。

【0024】

この14個のCys残基の中で改変されるCys残基は特に限定されるものではないが、膜貫通部位および粒子外部に存在するCys残基でC末端に近い位置にあるものが好ましい。具体的には、76, 90, 137, 138, 139, 147, 149, 221番目を置換したものが好ましく、これらの8つのCys残基から選ばれた複数のCys残基を置換したものがより好ましい。その中でも、上記8つのCys残基をすべて置換したもの、あるいは上記8つのCys残基のうち137番目以外または138番目以外のCys残基以外を置換したもの、が特に好ましい。

【0025】

上記Cys残基を置換する場合に、Cys残基を置換するアミノ酸は特に限定しないが、膜貫通部位に存在するアミノ酸は脂質2重膜の疎水性の層に存在することとなるので疎水性であることが好ましい。疎水性のアミノ酸は、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、バリンがあり、この中でもアラニン残基に置換するのが好ましい。一方、粒子外部および内部に存在すると予測されるCys残基は親水性のアミノ酸に置換することが好ましい。親水性のアミノ酸は、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、ヒスチジン、リシン、セリン、スレオニンがあり、この中でもセリン残基に置換するのが好ましい。

【0026】

Cys残基の改変は、一般的に用いられる、部位特異的突然変異導入法を用いることができる。例えば、PCR法を利用して塩基配列に点変異を導入し変異タンパク質を作製する方法や、部位特異的突然変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, Gene 152, 271-275(1995)他) 等が挙げられる。また、文献「細胞工学別冊 新細胞工学実験プロトコール 秀潤社 241-248 (1993)」に記載の方法、さらには、市販のキット (例えば、Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit ストラタジーン社製) を利用する方法も可能である。

【0027】

この中でも、アミノ酸置換には、特にPCR法を用いて変異を導入する方法が好ましい。これは具体的に説明すると、置換したいCys残基をコードする塩基配列部分に、変異を導入したプライマーをハイブリダイズさせてPCR法によって増幅させる方法である。これにより、Cys残基が他のアミノ酸に置換されたタンパク質をコードする遺伝子を増幅することができる。この遺伝子を上述したように、真核生物等を用いて発現させることで、Cys残基が置換されたタンパク質からなる中空ナノ粒子を作成することができる。

【0028】

また、本発明のタンパク質中空ナノ粒子では、以上のような方法によって得られた粒子表面のレセプターを任意の生体認識分子に改変することにより、肝細胞以外にも、任意の細胞及び組織に極めて高い特異性で物質を運搬、導入することが可能となる。

【0029】

もちろん、粒子形成能を有するタンパク質は、上記のB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質に限られるものではなく、粒子を形成することができるタンパク質であれば、どのようなものでもよく、動物細胞、植物細胞、ウイルス、菌類等に由来する天然タンパク質や、種々の合成タンパク質等が考慮される。また、例えばウイルス由来の抗原タンパク質等が生体内において抗体を惹起する可能性がある場合などは、改変して抗原性を減少させたものを粒子形成能を有するタンパク質として用いてもよい。例えば、粒子形成能を有するタンパク質としては、国際出願WO01/64930に開示される抗原性を減少させたB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質であってもよいし、同国際出願に開示されるその他の改変型タンパク質（B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を、遺伝子操作技術を用いて改変したタンパク質）であってもよい。また、B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質や同タンパク質を改変した改変型タンパク質に、さらに増殖因子や抗体などの他のタンパク質を付加したものを、粒子形成能を有するタンパク質として用いてもよい。

【0030】

粒子形成能を有するタンパク質に導入される生体認識分子（粒子形成能を有す

るタンパク質に生体認識分子が含まれる場合と、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子を融合（または直接間接に結合）させる場合とを両方含む）としては、例えば成長因子、サイトカイン等の細胞機能調節分子、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプターなどの細胞および組織を識別するための分子、ウィルスおよび微生物に由来する分子、抗体、糖鎖、脂質などが好ましく用いられる。具体的には、癌細胞に特異的に現れるEGF受容体やIL-2受容体に対する抗体やEGF、またHBVの提示するレセプターも含まれる。これらは、目的とする細胞、あるいは組織に応じて適宜選択される。なお、ここで「生体認識分子」とは、特定の細胞を認識する分子（換言すれば、特定の細胞に対する認識能を本発明の中空ナノ粒子に付与する分子）のことをいう。

【0031】

以上のように作製された本発明の中空ナノ粒子は、特定の細胞に対して特異的に細胞導入物質を送り込むものとして有用である。例えば、本発明の中空ナノ粒子として、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質からなる粒子を用い、これに細胞導入物質を包含した薬剤を静脈注射などによって体内に投与すれば、当該粒子は体内を循環し、粒子表面に提示した肝細胞特異的レセプターにより肝細胞に導かれ、感染する。そして、細胞導入物質が肝細胞中に送り込まれ、細胞導入物質の肝臓組織特異的な導入が行われる。

【0032】

このタンパク質中空ナノ粒子に内包される細胞導入物質としては、例えばDNA、RNAなどの遺伝子、天然あるいは合成タンパク質、オリゴヌクレオチド、ペプチド、薬剤、天然あるいは合成化合物など、どのようなものであってもよい。

【0033】

これらの細胞導入物質を上記の中空ナノ粒子に封入する方法としては、通常の化学的、分子生物学的実験手法で用いられる様々な方法が適用される。たとえば、エレクトロポレーション法、超音波法、単純拡散法、あるいは電荷を有する脂質を用いる方法等が好ましく例示される。また、細胞導入物質としてタンパク質を用いる場合は、粒子形成能を有するタンパク質に細胞導入物質を融合させて粒

子形成する方法もある。粒子形成能を有するタンパク質に細胞導入物質を融合させる方法とは、例えば、B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質をコードする遺伝子と、その下流側に上記タンパク質薬剤をコードする遺伝子とが挿入されたプラスミドを作製し、このプラスミドを用いて真核細胞に粒子を形成させることによって、粒子を形成するB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質にタンパク質薬剤が融合した薬剤を製造する方法である。

【0034】

なお、薬剤の投与方法としては、静脈注射による投与のほかに、経口投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与等が挙げられる。

【0035】

このように、本発明の薬剤を用いれば、*in vivo*あるいは*in vitro*で細胞、または組織に特異的に物質を導入することができ、特定細胞または組織に物質を導入することを各種疾患の治療法あるいは治療法の1ステップとして行うことも可能になるのである。

【0036】

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

【0037】

【実施例】

以下の実施例において、HBsAgとは、HBVの外被タンパク質であるB型肝炎ウイルス表面抗原 (Hepatitis B virus surface Antigen) を示す。HBsAgは、図2に示すように226個のアミノ酸から構成されるSタンパク質を含んでいる。Sタンパク質のN末端側に55アミノ酸 (pre-S2 peptide) が付加したものがMタンパク質、Mタンパク質のN末端側に、108もしくは119アミノ酸 (pre-S1 peptide) が付加したものがLタンパク質である。

【0038】

HBsAg Lタンパク質の上記Pre-S領域 (pre-S1, pre-S2) は、HBVが肝細胞に結合する際に、それぞれ重要な役割を担うことが知られている。Pre-S1は

、肝細胞に直接結合する部位を持ち、pre-S2は、血中の重合アルブミンを介して肝細胞に結合する重合アルブミンレセプターを有するのである。

【0039】

真核細胞でHBsAgを発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積される。HBsAgのLタンパク質は、分子間で凝集を起こし、小胞体膜を取り込みながら、出芽様式でルーメン側に粒子として放出される。

【0040】

以下の実施例では、HBsAgのLタンパク質を用いた。

【0041】

(実施例1) Cys残基が置換されたHBsAg Lタンパク質をコードする遺伝子プラスミドの作成

発明者らによって報告されたJ.Biotechnol., Vol.33:, No.2, 157-174, 1994記載の方法に基づいて、pGLDLIIP39-RcTに組み込まれたHBsAg Lタンパク質をコードする遺伝子断片を、動物細胞発現用プラスミドpTB1455のSR α 'プロモーターの下流に組み込んで、pB0442プラスミドを得た。HBsAg Lタンパク質の塩基配列は配列番号1に示され、アミノ酸配列は配列番号2に示されている。得られたpB0442プラスミドにより、DNAをメチル化する大腸菌K12株(DH5 α またはXL-1 Blue)を形質転換し、メチル化されたpB0442プラスミドを精製した。

【0042】

pB0442プラスミドのHBsAg Lタンパク質をコードする領域において、Cys残基をコードする塩基配列を、Ala残基もしくはSer残基をコードする塩基配列に改変するために、pB0442プラスミドを鋳型としてPCR法を用いた部位特異的突然変異導入法により変異を導入した。以下に図3を用いて48番目のCys残基がSer残基に置換されたHBsAg Lタンパク質遺伝子プラスミドの作成方法を例に挙げて詳細に説明する。

【0043】

鋳型プラスミドとしてのpB0442プラスミドは図3に示すように、SR α 'プロモ

ーターとその下流にH B s A g Lタンパク質をコードする領域を有している。このプラスミドにおけるH B s A g Lタンパク質の48番目のCys残基をコードするコドン (tgt) を含む領域に、変異を導入した合成オリゴヌクレオチド(プライマー)をハイブリダイズさせて、当該プラスミドを鋳型としてP C R反応により、鎖を伸長させた。ここで、変異を導入したプライマーは、鋳型の48番目のCys残基のコドンとミスマッチ (鋳型がtgt、プライマーがaga) となるように設計した。これによって、48番目のCysコドン(tgt)がSerコドン (tct) に置換されたプラスミドを増幅することができる。

【0044】

表1に、以上と同様の方法で、14個の各Cys残基を1つ置換することができるミスマッチプライマーセット(1~14行目)、および近隣の2つまたは3つのCys残基を同時に置換するミスマッチプライマーセット(15~17行目)の塩基配列を示す。置換位置は置換されるCys残基の位置(Sタンパク質アミノ酸のN末端から数えた数)を示し、対応するプライマー(センス側とアンチセンス側との一組)のサイズと配列、およびP C R反応におけるアニーリング温度を示した。置換位置の表記は、「C/48/S」が48番目のCys残基をSer残基に置換させることを意味し、「C/76/A」が76番目のCys残基をAla残基に置換させることを意味するものとする。

【0045】

【表1】

置換位置	プライマー No.	センスプライマー	サイズ (mer)	プライマー No.	アンチセンスプライマー	サイズ (mer)	アニー リング 温度 (°C)
1 C/48/S	393	GCACCCACGCTCCTCGCCAAAATTC	26	394	GAATTTGGCCAGGAGAGCGTGGGTGC	26	52
2 C/65/S	444	TCACCAAGCTCTAGTCTCCTCAATTTG	26	445	CAAAATGGAGGACTAGAGGTTGGTGA	26	53
3 C/69/S	446	CTTGCTCTCCAATAAGTCTCTGGCTATCG	28	447	CGATAGCCAGGACTTATTGGAGGACAAG	28	40
4 C/76/A	520	TATCGCTGGATGGCGCTGCGGCGTTTATC	30	521	AAAACGCCGAGCGCCATCCAGCGATAGCC	30	53
5 C/90/A	414	CATCCTGCTGTACCCCTCATCTTCTTG	28	415	CAAGAAGATGAGGGCTAGCAGCAGGATG	28	55
6 C/107/A	474	ATGTTGCCGTTGCGCTCTACTTCCA	27	475	TGGAAGTAGAGCGGCAACGGGCAACAT	27	49
7 C/121/S	476	AGCACGGGGCCTTGAAGACCTGCACGATT	30	477	GTGCAGGTCTTCGAAGGCCCGTGTGGTG	30	49
8 C/124/S	478	CCATGCAAGACCTCGACGATTCTGCT	27	479	AGCAGGAATCGTCGAGGTCTTGCATGG	27	49
9 C/137/S	480	ATGTTCCCTCTAGTTGCTGTACAA	25	481	TTGTACAGCAACTAGAGGGAAACAT	25	45
10 C/138/S	482	TTTCCCTCTTGCAGCTGTACAAAAC	25	483	TTTTGTACAGCTGCAAGAGGGAAAC	25	45
11 C/139/S	484	CCTCTTGTGCTCGACAAAACCTTCG	26	485	CGAAGGTTTTGTGAGCAACAAGAGG	26	45
12 C/147/S	466	TCGGACGGAACAGCAGCTTGTATTCC	26	467	GGAATACAAGTGTGTTTCCGTCCGA	26	53
13 C/149/A	462	CGGAAACTGGACGGGCCATTCCCATCCCA	28	463	TGGGATGGGAATGGCCGTGCAGTTCCG	28	45
14 C/221/A	464	ACCAATTTCTTTGCGCTTTGGGTATAC	28	465	GTATACCCAAAAGCGCAAGAAAATTGGT	28	45
15 C/147, 149/S	568	CCTTCGGACGGAAACAGCAGCGCCATTCCG	30	569	GGGAATGGCCGTGCTGTTTCCGTCCGAAGG	30	60
16 C/138, 139/S	580	TTTCCCTCTTGTAGCTCGACAAAAC	25	581	GTTTTGTCGAGCTACAAGAGGGGAAA	25	45
17 C/137, 138,139/S	582	ATGTTGCCCTCTTCTAGCTCGACAA	25	583	TTGTCGAGCTAGAAGAGGGGAAACAT	25	50

【0046】

また、これら17組34個のプライマーの塩基配列は、表1の順番どおりに配

列番号 3 ～ 3 6 に示されている。すなわち、配列番号 1 および 2 には 48 番目の Cys 残基を 1 つ置換するプライマーセットの塩基配列が示され、以下同様に、配列番号 3 および 4 が 65 番目、配列番号 5 および 6 が 69 番目、配列番号 7 および 8 が 76 番目、配列番号 9 および 1 0 が 90 番目、配列番号 1 1 および 1 2 が 107 番目、配列番号 1 3 および 1 4 が 121 番目、配列番号 1 5 および 1 6 が 124 番目、配列番号 1 7 および 1 8 が 137 番目、配列番号 1 9 および 2 0 が 138 番目、配列番号 2 1 および 2 2 が 139 番目、配列番号 2 3 および 2 4 が 147 番目、配列番号 2 5 および 2 6 が 149 番目、配列番号 2 7 および 2 8 が 221 番目の Cys 残基を 1 つ置換するプライマーセットの塩基配列を示している。そして、配列番号 2 9 および 3 0 が 147, 149 番目、配列番号 3 1 および 3 2 が 138, 139 番目の Cys 残基、配列番号 3 3 および 3 4 が 137, 138, 139 番目の Cys 残基を置換するプライマーセットの塩基配列を示している。

【 0 0 4 7 】

P C R 反応は、50 μ l 中に鋳型 DNA 50nmol、合成 DNA プライマー (変異導入プライマー) 各 15pmol、dATP 40nmol、dCTP 40nmol、dGTP 40nmol、dTTP 40nmol、Pfu turbo DNA polymerase 2.5 単位、10 mM KCl、10 mM (NH₄)₂SO₄、20 mM Tris-Cl (pH 8.75)、2 mM MgSO₄、0.1% Triton (登録商標) X-100、100 μ g/ml BSA 中で、9 5 $^{\circ}$ C 3 0 秒加熱後、9 5 $^{\circ}$ C 3 0 秒、アニーリング 1 分、6 8 $^{\circ}$ C 2 0 分の反応を 1 8 サイクル行なった。アニーリングの温度はプライマーにより異なり、表 1 に記載したとおりとした。

【 0 0 4 8 】

反応終了後、メチル化された DNA を消化する制限酵素 DpnI (10,000 単位/mL) を 1 μ l 加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間処理した。鋳型として用いた、Cys 残基が置換されていないプラスミド DNA は、上記したように DNA をメチル化する大腸菌を形質転換して得ているので、鋳型 DNA はメチル化されている。一方、Cys 残基が置換されたものはメチル化されていない。したがって、制限酵素 DpnI 処理により、鋳型 DNA のみが消化される。残った DNA、即ち Cys 残基が置換された L タンパク質 DNA により大腸菌 XL-1 Blue を形質転換し、得られたコロニーからプラスミド DNA を抽出した。得られたプラスミド DNA は、制限酵素地図および塩基配列により、目的の変

異が導入されていることを確認した。

【0049】

また、以上のようにして作成したCys残基置換型Lタンパク質プラスミドを鋳型として再度他のミスマッチプライマーによってPCR反応を行うことにより、さらに多くのCys残基を置換したLタンパク質遺伝子プラスミドを作成した。

【0050】

このようにして、1～9個のCys残基が改変された、27個のプラスミドを作成した。27個のプラスミド番号(No.) および名前(PB0***)、その発現タンパク質における置換位置を表2に示した。また、図4にHBsAg Lタンパク質の1次構造を直線で示し、Sタンパク質におけるシステインの位置(矢印)と、各プラスミドの遺伝子がコードするSタンパク質のアミノ酸置換位置(S(セリン)またはA(アラニン)が示す位置)を図示した模式図を示した。

【0051】

【表 2】

プラスミド プラスミド名		
No.	pBO No.	置換位置
1	454	C/48/S
2	497	C/65/S
3	498	C/69/S
4	468	C/76/A
5	455	C/90/A
6	456	C/107/A
7	460	C/121/S
8	461	C/124/S
9	465	C/137/S
10	466	C/138/S
11	467	C/139/S
12	499	C/147/S
13	469	C/149/A
14	470	C/221/A
15	511	C/76,90/A
16	514	C/90/A, C/139/S
17	518	C/90/A, C/147/S
18	513	C/90,149/A
19	512	C/90,221/A
20	519	C/76,90,221/A
21	520	C/76,90,149,221/A
22	528	C/76,90,149,221/A, C/139/S
23	529	C/76,90,149,221/A, C/147/S
24	533	C/76,90,149,221/A, C/139,147/S
25	539	C/76,90,149,221/A, C/138,139,147/S
26	540	C/76,90,149,221/A, C/137,138,139,147/S
27	541	C/76,90,149,221/A, C/107,137,138,139,147/S

【0052】

(実施例 2) 変異導入HBsAg粒子のCOS7細胞による発現と検出

(1) 変異導入HBsAg粒子のCOS7細胞による発現

サル腎由来細胞株COS7をウシ胎児血清 (FBS) 5%を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で37℃, 5%CO₂下で培養し、T-75フラスコ (ファルコン社製) 1枚あたり4x10⁶個の細胞を得た。一方、RPMI1640培地10mlにグルコース18.5mgを加え、さらにこの溶液1mlに2μlの50mMのジチオスレイトール (DTT) を加えた溶液を用意した。この溶液0.3mlに上記の4x10⁶個のCOS7細胞と実施例1で得られたプラスミドDNA5μgを懸濁し、エレクトロポレーションキュベット (電極間距離4mm) に移した後、エレクトロポレーター (バイオラッド社製) を用いて950μF、0.3kVの条件で遺伝子導入を行なった。キュベッ

ト中の細胞を 6 0 mmディッシュ (ファルコン社製) へ移し、5 %FBSを含むDMEM 6 Ml中にて 3 7 ℃, 5 %CO₂の条件下で14から15時間培養を行なった後、培地を 6 Mlの無血清培地CHO-SFM II (インビトロジェン社製) に交換し、さらに 4 日間培養を継続して培地を回収した。

(2) 変異導入HBsAg粒子の抗原性による検出

回収した培地 9 0 μ l に 1 %FBSを含むダルベッコリン酸緩衝液 (PBS) 9 0 μ l を加えて、IMX HBsAgアッセイシステム(ダイナボット社製)により抗原性を検出した。ここで、抗原性を有している場合、HBsAg粒子が形成されたと判断し、これにより培養液中に変異型HBsAg粒子の存在を確認した。図 5 にプラスミド番号 1 ~ 2 5 のプラスミドにより変異を導入された 2 5 個の変異型HBsAgの発現を検出した結果を示した。抗原性は野生型を 1 0 0 とした場合の相対値で示しており、プラスミドによる形質転換を行わず、粒子形成が行われていない培養液を検出した結果を陰性対照(ネガティブ)とした。なお、3 回以上行なった実験に関しては偏差値をバーで示してある。

【0 0 5 3】

1 4 個の各Cys残基を 1 箇所置換した結果(1 ~ 1 4 行目)によると、膜貫通領域に存在するCys残基を置換したものが良好な抗原性を有していた。特に、76, 90, 149, 221番目を置換したものが野生型と同等かそれ以上の抗原性を有していた。また、粒子外部に存在するCys残基でもC末端に近い部位を置換したものは、良好な抗原性が保たれていた。特に、139, 147番目を置換したものが野生型と同等かそれ以上の抗原性を有していた。以上の特に抗原性が良好なCys残基置換位置をさらに組み合わせた、2 ~ 9 個のCys残基を置換したHBsAg Lタンパク質を作成した(1 5 ~ 2 5 行目)。これについては、すべて野生型と同等かそれ以上の抗原性を有していた。

(3) 変異導入HBsAg粒子のウェスタンブロッティングによる検出

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) とウェスタンブロット法 (Western Blotting) を用いて、変異型粒子分子量および二量体化した粒子の有無を検討した。

【0 0 5 4】

詳しくは、回収した培地 $180\mu\text{l}$ に IMX HBsAg アッセイシステムの抗 HBs マウスモノクローナル抗体固定化マイクロパーティクルを $60\mu\text{l}$ 加えて、ゆっくりチューブを回転させながら 1 晩、 4°C においた。3 分間卓上型高速遠心機を用いてマイクロパーティクルと共に培地中の粒子を沈降させ、得られた沈澱を 0.5Ml の TBST (10mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween20) を加えて懸濁し、さらに遠心を行なって沈澱を回収する洗浄操作を 5 回くり返した。

【0055】

この沈澱を 2 等分して、1 つは還元条件下、もう 1 つは非還元条件下で SDS-PAGE を行なった。還元条件下とは、上記沈澱をメルカプトエタノールを加えて 95°C 、5 分間処理してから SDS-PAGE を行ったもので、システイン残基同士のジスルフィド結合は防がれ、タンパク質がポリマー化されていない状態で検出される。一方、非還元条件下とはメルカプトエタノールを加えず熱処理もしない沈澱で SDS-PAGE を行ったもので、タンパク質はポリマー化された状態で検出される。得られた電気泳動ゲルを 1 次抗体に IMX HBsAg アッセイシステムの抗 HBs ヤギ抗体・ビオチン結合体、2 次抗体にアルカリホスファターゼ標識抗ビオチンウサギ抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった(図 6 (a) ~ (h))。(a) ~ (d) は還元条件下の結果を、(e) ~ (h) は非還元条件下の結果を示し、レーン上の数字は Cys 置換位置を示している。これによれば、すべての変異導入 HBsAg 粒子において、還元条件下では 53kDa 付近にバンドが見られ、非還元条件下においては 100kDa 付近にバンドが見られた。よって、変異型 HBsAg が 53kDa の分子量を持ち、粒子形成時には 2 量体で存在していることが確認された。HBsAg が 2 量体で存在することは、粒子形成能と関連すると考えられる。

【0056】

(実施例 3) 変異導入 HBsAg 粒子を用いた HepG2 細胞への遺伝子導入 pGLDLIIP39-RcT に組み込まれた HBsAg L タンパク質をコードする遺伝子断片を、実施例 1 で作成された変異型 HBsAg 遺伝子と入れ換えて、酵母での発現のための変異型 HBsAg 遺伝子プラスミドを作成した。この変異型 HBsAg 遺伝子プラスミドの酵母による発現(粒子作成方法)は国際出

願 WO 01/64930 に開示される方法に従った。

【0057】

以下に、得られた変異型 HBsAg 粒子を用いて、GFP 遺伝子をヒト肝癌細胞 HepG2 に導入する方法を説明する。

【0058】

まず、3.5 cm ガラス底皿シャーレにヒト肝癌細胞 HepG2 を 1×10^5 cells/well になるように植菌し、37℃、5% CO₂ 存在下で 10% ウシ胎児血清を含む D-MEM を用いて一晩培養し、指数増殖期となるようにした。変異導入型 HBsAg 粒子は、緑色蛍光タンパク質発現プラスミド (GFP expression plasmid pTB701-hGFP) と混合して、間隔 4 mm のキュベットを使用して、110 V、950 μ F の条件でエレクトロポレーションを行なうことで、GFP 発現プラスミドを封入された。GFP 発現プラスミドを包含する HBsAg 粒子を HepG2 培養液へ混合し、37℃、5% CO₂ 存在下で D-MEM を用いて 4 日間培養した後、HepG2 内での GFP の発現の様子を共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した (図 7 (a))。比較例として、野生型 HBsAg 粒子についても、同様の方法ではほぼ同数の HepG2 細胞が培養されたシャーレに、等量の GFP 遺伝子プラスミドを包含させた粒子を等量 HepG2 培養液に混合し、37℃、5% CO₂ 存在下で D-MEM を用いて 4 日間培養した後、HepG2 内での GFP の発現の様子を共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した (図 7 (b))。

【0059】

図 7 によると、変異導入型 HBsAg による物質導入を行った方が蛍光を発する細胞が多く、つまり、HBsAg 粒子を形成するタンパク質に変異を導入することで、細胞に遺伝子を導入する効率が向上したと言える。

【0060】

以上より、この発明の Cys 残基を置換した HBsAg 粒子を用いて、培養細胞レベルで、ヒト肝細胞に対してより高い効率で特異的に遺伝子を導入できることが示された。

【0061】

(実施例 4) Cys 残基 7 個および 8 個を変異させた変異型 HBsAg 遺伝子に

よる、変異型HBsAg粒子を用いたHepG2細胞への遺伝子導入

さらに、変異型HBsAg遺伝子のうち、7個、または8個のシステインを置換したものを使用して、HepG2細胞への遺伝子導入を試みた。変異型HBsAg遺伝子としては、野生型のHBsAg遺伝子のうち、76, 90, 149, 221番目のCys残基をAla残基に置換し、138, 139, 147番目のCys残基をSer残基に置換したプラスミドpB0 539と、76, 90, 149, 221番目のCys残基をAla残基に置換し、137, 139, 147番目のCys残基をSer残基に置換したプラスミドpB0 552と、76, 90, 149, 221番目のCys残基をAla残基に置換し、137, 138, 139, 147番目のCys残基をSer残基に置換したプラスミドpB0 540とを使用した(表3)。なお、それぞれプラスミドpB0 539、pB0 552、pB0 540から生成されるHBsAg粒子は、それぞれBNP-Lm7a、BNP-Lm7b、BNP-Lm8と称する。

【0062】

【表3】

プラスミド	発現粒子	置換位置
pB0539	BNP-Lm7a	C/76,90,149,221/A C/138,139,147/S
pB0552	BNP-Lm7a	C/76,90,149,221/A C/137,139,147/S
pB0540	BNP-Lm8	C/76,90,149,221/A C/137,138,139,147/S

【0063】

(1) 変異型HBsAg粒子の作製

変異型HBsAg粒子を得るために、エレクトロポレーション法でCOS7細胞に変異型HBsAg粒子発現ベクターDNAを導入し、4日間培養後、細胞培養上清を集め、遠心濾過濃縮し、粒子を回収した。実験操作を以下に詳しく説明する。

【0064】

まず、サンプル数に合わせて、5%FCS-MEM培地でCOS7細胞を培養しておき、80%コンフルエントに達した細胞を用意する。培地を新しいものに交換し、6～8時間後にトリプシン処理して細胞を集め血球計算盤で計算した。

計数後、1.5 ml チューブ 1 本につき細胞が 4×10^6 個になるように分注し遠心した。遠心条件は、30 秒、12000 rpm である。遠心後、上清を吸引除去し、エレクトロポレーション溶液 (Epmedium: RPMI-1640 + 10 mM グルコース + 0.1 mM DDT) を 300 μ l 加え細胞を懸濁した。

【0065】

この細胞懸濁液に上述した表 3 のプラスミド DNA pB0 539、pB0 552、あるいは pB0 540 を 5 μ g を加え、氷上であらかじめ冷やしておいたキュベット (4 mm ギャップ) に移した。これに 0.3 KV、950 μ F の条件で電圧を印加 (エレクトロポレーション) 後、すぐに氷冷した。そして、キュベット内の細胞を 8 ml の培地に再懸濁し、6 cm シャーレ 2 枚に二等分して播種した。

【0066】

37℃で14～15時間培養した後、培地を 6 cm シャーレ一枚につき CHO-S-SFMII (GIBCO) 3 ml に交換し、さらに4日間培養した。4日後、細胞と培養上清を別々に回収し、細胞は-20℃で保存し、培養上清は4℃で保存した。それぞれのプラスミド DNA について4回ずつエレクトロポレーションを行った。

【0067】

(2) IMxHBsAg アッセイシステムによる粒子濃度の測定
上記培養上清を用いて以下の IMx による解析を行った。

【0068】

IMxHBsAg アッセイシステム (ダイナボット社) は、サンドイッチ法を利用した EIA により培養上清中の HBs 抗原を検出する全自動イムノアッセイシステムである。これを用いて培養上清中に検出された抗原性は「RATE 値」として表現されるが、必要に応じてシステムに添付されている標準 HBsAg (ヒト血清由来 HBsAg 粒子) が示す抗原性と比較して、発現した粒子濃度を HBsAg 当量に換算した。測定試料は、培養上清 90 μ l と 1% 牛胎児血清含有ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (希釈液) 90 μ l を混合したものを使用した。測定する時は、常にポジティブコントロール (すなわち、標準 HBsAg) と、ネガティブコントロール (すなわち、希釈液のみ) と、をセットし、検量線を作成

してHBsAg当量を算出した。また、野生型HBsAg遺伝子ベクター(pB0411)を導入したCOS7細胞の培養液上清とも比較した。その結果を表4に示す。

【0069】

【表4】

サンプル	RATE	粒子濃度(ng/ml)
ポジティブコントロール	201.1	—
ネガティブコントロール	3.6	—
野生型HBsAg粒子	94.7	132.9
BNP-Lm7a	15.7	17.7
BNP-Lm7b	15.4	17.2
BNP-Lm8	10.6	10.2

【0070】

この結果より、粒子の標準HBsAg当量(RATE値)がBNP-Lm7aで15.7、BNP-Lm7bで15.4、BNP-Lm8で10.6と、ネガティブコントロールと比べて高い値を示しており、全ての変異導入HBsAg蛋白質が、培養上清へ分泌発現されていることが確認されたと言える。

【0071】

(3) 遠心限外濾過濃縮法による濃縮

しかし、このIMxHBsAgアッセイシステムら求めたシステイン置換型の粒子濃度は低く、粒子発現量が少量であるため、使用の際には濃縮する必要があると考えられる。そこで、以下に示す遠心限外濾過濃縮を行った。

【0072】

培養上清16mlを遠心濾過濃縮用デバイス(Viva spin 1,000,000MWCO、Sartorius)に移し、3500rpm、45分、4℃の遠心条件で液量が800 μ lになるまで濃縮した。800 μ lのうち90 μ l分を用いてIMxでHBsAg当量を測定し、検量線から算出された抗原量をもとに回収率を計算したところ、回収率は40%前後であった。

【0073】

(4) L, S共発現粒子のIMxによるS抗原性の測定

5%FCS-MEM培地でCOS7細胞を培養しておき、80%コンフルエン

トに達した細胞を用意する。培地を新しいものに交換し、6～8時間後にトリプシン処理して細胞を集め、1.5 ml チューブ1本につき細胞が 4×10^6 個になるように分注し遠心した。遠心条件は、30秒、12000 rpmである。遠心後、上清を吸引除去し、エレクトロポレーション溶液 (Ep medium: RPMI-1640 + 10 mM グルコース + 0.1 mM DDT) を300 μ l 加え細胞を懸濁した。

【0074】

この細胞懸濁液に野生型のL粒子 (HBsAg Lタンパク質からなる粒子) 発現用プラスミドDNA (pB0441) あるいはシステイン改変型のL粒子発現用プラスミドDNA 5 μ g と野生型S粒子 (HBsAg Sタンパク質からなる粒子) 発現用プラスミドDNA (pB0603) あるいはシステイン改変型のS粒子発現用プラスミドDNA 1 μ g とを同時に加え、キュベット (4 mmギャップ) に移した。これに0.3 KV、950 μ Fの条件で電圧を印加 (エレクトロポレーション) 後、すぐに氷冷した。そして、キュベット内の細胞を8 ml の培地に再懸濁し、6 cmシャーレ2枚に二等分して播種した。

【0075】

37℃で14～15時間培養した後、培地を6 cmシャーレー一枚につきCHO-S-SFMII (GIBCO) 3 ml に交換し、さらに4日間培養した。4日後、細胞と培養上清を別々に回収し、細胞は-20℃で保存し、培養上清は4℃で保存した。培養上清の粒子濃度 (HBsAg 当量) をIMx HBsAg アッセイシステムを用いて測定した。

【0076】

【表5】

サンプル	RATE
ポジティブコントロール	255.0
ネガティブコントロール	6.2
野生型HBsAg粒子	363.9
BNP-Lm7b	58
BNP-Lm8	47.6

【0077】

この結果より、粒子のHBsAg当量(RATE値)が、BNP-Lm7bで58.0、BNP-Lm8で47.6であり、変異導入HBsAg粒子において(2)の実験より飛躍的に高い粒子濃度(HBsAg当量)を示した。

【0078】

(5) 変異型HBsAg粒子へのDNA導入

(3)で得た、濃縮した変異型HBsAg粒子(BNP-Lm8)と、GFP発現ベクターDNA500ngとを加え、すべてについて全量を500 μ lに調整した。エレクトロポレーション用4mmギャップキューベツト中、50V、750 μ Fでエレクトロポレーションし、5分間室温で放置した。これにより、GFP発現ベクターDNAが封入された変異導入HBsAg粒子が作製された。

【0079】

(6) GFP発現ベクターDNAを封入したL粒子によるHepG2細胞への遺伝子導入

6cmシャーレ1枚分のHepG2細胞をトリプシン処理して細胞を集め、血球計算盤で計数した。細胞数を確認し、8wellチャンバースライドに9000個/wellとなるように分注し、37℃で一晩培養した。このHepG2細胞に、(5)のGFP発現ベクターDNAを封入した変異型HBsAg粒子(GFP-BNP-Lm8)、およびGFP発現ベクターDNAを封入した野生型HBsAg粒子を添加した。また、ポジティブコントロールとしてHepG2細胞にGFP発現ベクターDNAとFuGene6(Roche社)との複合体を添加したもの、ネガティブコントロールとして粒子もベクターも含まないエレクトロポレーション用緩衝液のみ、あるいはGFP発現ベクターDNAのみを添加したものを用意した。3日後、共焦点顕微鏡で細胞の蛍光を観察した。なお、GFP発現ベクターDNAを封入したHBsAg粒子は、種々の割合のGFP発現ベクターを内包したものを作製した。

【0080】

図8は、その共焦点顕微鏡図を示し、各図面の上の写真が透過像であり、下の写真が蛍光像である。(a)はポジティブコントロール、(b)は粒子もベクターも含まないエレクトロポレーション用緩衝液のみのネガティブコントロール(

c) は GFP 発現ベクター DNA のみのネガティブコントロール、(d) は野生型 HBsAg 粒子 (HBsAg 粒子 (69 ng) + GFP 発現ベクター DNA (200 ng) を添加したもの、(e) は GFP-BNP-Lm8 粒子 (BNP-Lm8 (12 ng) + GFP 発現ベクター (200 ng)) を添加したもの、(f) は GFP-BNP-Lm8 粒子 (BNP-Lm8 (24 ng) + GFP 発現ベクター (200 ng) を添加したものである。

【0081】

また図 9 は、図 8 を拡大した図面である。なお、図 9 (a) が図 8 (a) を拡大したものであり、図 9 (b) が図 8 (e) を拡大したものであり、図 9 (c) が図 8 (f) を拡大したものである。

【0082】

これによれば、GFP 発現ベクターを封入した野生型粒子よりも GFP-BNP-Lm8 粒子を添加した方が細胞にはるかに強い緑色蛍光が認められ、GFP-BNP-Lm8 粒子を添加したものは、添加した粒子量が 10 ng と少量でも蛍光を観察することができた。また、実験を繰り返し、BNP-Lm8 粒子の DNA 導入効率の再現性を確認した。

【0083】

(7) BNP-Lm8 粒子の保存性

次に、回収直後の粒子の遺伝子導入能力が長期間保持されるのかを確認するために、粒子を回収した後 1 週間 4℃ で保存したあと、GFP 発現ベクター DNA を導入し、He p G 2 細胞の培地中に添加して、3 日後共焦点顕微鏡で蛍光を観察した。結果を図 10 に示す。各図面の左の写真が透過像であり、右の写真が蛍光像である。

【0084】

図 10 は、(a) がポジティブコントロール (GFP 発現ベクター DNA (200 ng) と FuGene 6 (0.5 μ l) との複合体を添加したもの)、(b) がネガティブコントロール (GFP 発現ベクター DNA 200 ng のみを添加したもの)、(c) が回収直後の (左側の 2 つ)、または 1 週間後の (右側 2 つ)、野生型 HBsAg 粒子に GFP 発現ベクターを導入して (野生型 HBsAg (WT) 6.4 ng + GFP 発

現ベクター 200 ng) 添加したもの、(d) は回収直後の (左側 2 つ)、または 1 週間後の (右側 2 つ)、BNP-Lm8 粒子に GFP 発現ベクターを導入して、(BNP-Lm8 (6.4 ng) + GFP 発現ベクター (200 ng)) 添加したものである。

【0085】

これによれば、1 週間 4℃ で保存した BNP-Lm8 粒子に GFP 発現ベクターを導入したものを添加しても、細胞に GFP 発現ベクターによる緑色の蛍光を確認することができ、GFP 発現ベクターを細胞内に良好に導入できた。つまり、BNP-Lm8 は良好な保存性を有していた。

【0086】

(8) BNP-Lm8 の肝細胞特異的な遺伝子導入

また、同様の実験を HepG2 細胞に対して行ったもの (図 11) と、HepG2 細胞の代わりにヒト大腸ガン由来細胞 WirDr を用いて行ったもの (図 12) とで比べた。ここで、図 11、図 12 の各図面の左が位相差像であり、右が蛍光像である。また、(a) はポジティブコントロール (GFP 発現ベクター DNA (200ng) と FuGene 6 (0.5 μ l) との複合体を添加したもの)、(b) はネガティブコントロール (GFP 発現ベクター DNA のみを添加したもの)、(c) は GFP 発現ベクターを内包する野生型 HBsAg 粒子 (野生型 HBsAg (WT) 14 ng + GFP 発現ベクター 200 ng) を添加したもの、(d) は GFP 発現ベクターを内包する BNP-Lm8 粒子 (BNP-Lm8 (5 ng) + GFP 発現ベクター (200 ng)) を添加したものである。

【0087】

これによれば、GFP 発現ベクターを内包する野生型 HBsAg 粒子を添加した HepG2 細胞、GFP 発現ベクターを内包する BNP-Lm8 粒子を添加した HepG2 細胞では、GFP 発現ベクターが導入されたが、ヒト大腸ガン由来細胞 WirDr には導入されなかった。したがって、BNP-Lm8 粒子でもヒト肝細胞特異的な遺伝子導入が行われることが分かった。

【0088】

(9) BNP-Lm8 と BNP-Lm7b との遺伝子導入効率

次に、GFP-BNP-Lm8とGFP-BNP-Lm7bとにおけるGFPの細胞への導入効率を調べるため、同様の実験をGFP-BNP-Lm8を用いて行ったものと、GFP-BNP-Lm7bを用いて行ったものとで比べた(図13)。ここで、図13の(a)はポジティブコントロール(GFP発現ベクターDNA(200ng)とFuGene6(0.5 μ l)との複合体を添加したもの)、(b)はネガティブコントロール(GFP発現ベクターDNAのみを添加したもの)、(c)はGFP発現ベクターDNAを内包する野生型HBsAg粒子(野生型HBsAg(WT)3.2ng+GFP発現ベクターDNA200ng)を添加したもの、(d)はGFP発現ベクターDNAを内包する野生型HBsAg粒子(野生型HBsAg(WT)6.4ng+GFP発現ベクターDNA200ng)を添加したもの、(e)はGFP発現ベクターDNAを内包するBNP-Lm8粒子(BNP-Lm8(3.2ng)+GFP発現ベクターDNA(200ng)を添加したもの、(f)はGFP発現ベクターDNAを内包するBNP-Lm7b粒子(BNP-Lm8(6.4ng)+GFP発現ベクターDNA(200ng)を添加したもの、(g)はGFP発現ベクターDNAを内包するBNP-Lm7b粒子(BNP-Lm8(3.2ng)+GFP発現ベクターDNA(200ng)を添加したもの、(h)はGFP発現ベクターDNAを内包するBNP-Lm8粒子(BNP-Lm8(6.4ng)+GFP発現ベクター(200ng)を添加したものである。

【0089】

これによれば、GFP発現ベクターDNAを内包するBNP-Lm7b粒子の添加によっても細胞内に強い蛍光が観察されたが、GFP発現ベクターDNAを内包するBNP-Lm8粒子の添加で、より強い蛍光が観察された。

【0090】

以上の結果をまとめると、システインを置換したHBsAg粒子、特に、BNP-Lm8が、野生型HBsAg粒子より蛍光が強く観察され、ヒト肝細胞、動物細胞等の細胞へのDNA導入効率あるいは粒子内包能が高いということが分かった。さらに、肝細胞特異性も保持されていた。また、7個のシステインを置換したBNP-Lm7b粒子と、BNP-Lm8とは、共に野生型粒子より蛍光が

強く観察されたが、BNP-Lm8の方がBNP-Lm7b粒子より強い蛍光が観察された。つまり、粒子形成に不要と考えられるシステインを全て置換したBNP-Lm8は野生型粒子よりも細胞へのDNA導入効率が高い事がわかった。

【0091】

【発明の効果】

本発明の中空ナノ粒子は、以上のように、物質を細胞特異的に運搬するという機能を保ちつつ、粒子構造を安定化し、さらに効率よく物質を細胞へ導入させることができるという効果を奏する。

【0092】

このようにして作成した薬剤は、静脈注射などといった簡便な方法で、特定の細胞または組織に対して選択的かつ効率的に疾患治療用の細胞導入物質を送り込むことができるので、従来の遺伝子治療と大きく異なり、外科手術を必要とせず、副作用の心配も極めて低く、そのまま臨床応用可能なものである。

【0093】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Hollow nano-particles composed of cysteine-modified proteins, and their use as a therapeutic drug

<130>P023P10

<150> JP2002-191386

<151> 2002-6-28

<160> 36

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1218

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1218)

<400> 1

atg aga tct ttg ttg atc ttg gtt ttg tgt ttc ttg cca ttg gct gct 48

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala

1

5

10

15

ttg ggt aag gtt cga caa ggc atg ggg acg aat ctt tct gtt ccc aat 96

Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn

20

25

30

cct ctg gga ttc ttt ccc gat cac cag ttg gac cct gcg ttc gga gcc 144

Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala

35

40

45

aac tca aac aat cca gat tgg gac ttc aac ccc aac aag gat caa tgg 192

Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp

50

55

60

cca gag gca aat cag gta gga gcg gga gca ttc ggg cca ggg ttc acc 240

Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr
65 70 75 80

cca cca cac ggc ggt ctt ttg ggg tgg agc cct cag gct cag ggc ata 288
Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile
85 90 95

ttg aca aca gtg cca gca gca cct cct cct gcc tcc acc aat cgg cag 336
Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln
100 105 110

tca gga aga cag cct act ccc atc tct cca cct cta aga gac agt cat 384
Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His
115 120 125

cct cag gcc atg cag tgg aat tcc aca aca ttc cac caa gct ctg cta 432
Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu
130 135 140

gat ccc aga gtg agg ggc cta tat ttt cct gct ggt ggc tcc agt tcc 480
Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser
145 150 155 160

gga aca gta aac cct gtt ccg act act gcc tca ccc ata tct ggg gac 528
Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp
165 170 175

cct gca ccg aac atg gag aac aca aca tca gga ttc cta gga ccc ctg 576
Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu

180

185

190

ctc gtg tta cag gcg ggg ttt ttc ttg ttg aca aga atc ctc aca ata 624

Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile

195

200

205

cca cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct ctc aat ttt cta ggg gga 672

Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly

210

215

220

gca ccc acg tgt cct ggc caa aat tcg cag tcc cca acc tcc aat cac 720

Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His

225

230

235

240

tca cca acc tct tgt cct cca att tgt cct ggc tat cgc tgg atg tgt 768

Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys

245

250

255

ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc ctg ctg cta tgc ctc atc 816

Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile

260

265

270

ttc ttg ttg gtt ctt ctg gac tac caa ggt atg ttg ccc gtt tgt cct 864

Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro

275

280

285

cta ctt cca gga aca tca acc acc agc acg ggg cca tgc aag acc tgc 912

Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys

290

295

300

acg att cct gct caa gga acc tct atg ttt ccc tct tgt tgc tgt aca 960
Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr
305 310 315 320

aaa cct tcg gac gga aac tgc act tgt att ccc atc cca tca tcc tgg 1008
Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp
325 330 335

gct ttc gca aga ttc cta tgg gag tgg gcc tca gtc cgt ttc tcc tgg 1056
Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
340 345 350

ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg ttc gta ggg ctt tcc ccc 1104
Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro
355 360 365

act gtt tgg ctt tca gtt ata tgg atg atg tgg tat tgg ggg cca agt 1152
Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser
370 375 380

ctg tac aac atc ttg agt ccc ttt tta cct cta tta cca att ttc ttt 1200
Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe
385 390 395 400

tgt ctt tgg gta tat att 1218
Cys Leu Trp Val Tyr Ile
405

<210> 2

<211> 406

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 2

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala

1

5

10

15

Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn

20

25

30

Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala

35

40

45

Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp

50

55

60

Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr

65

70

75

80

Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile

85

90

95

Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln

100

105

110

Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His

115

120

125

Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu

130

135

140

Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser

145

150

155

160

Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp

165

170

175

Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu

180

185

190

Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile

195

200

205

Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly

210

215

220

Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His

225

230

235

240

Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys

245

250

255

Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile

260

265

270

Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro
 275 280 285

Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys
 290 295 300

Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr
 305 310 315 320

Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp
 325 330 335

Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
 340 345 350

Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro
 355 360 365

Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser
 370 375 380

Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe
 385 390 395 400

Cys Leu Trp Val Tyr Ile
 405

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

gcaccacgt ctcctggcca aaattc

26

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

gaattttggc caggagacgt gggtgc

26

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

tcaccaacct ctagtcctcc aatttg

26

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

caaattggag gactagaggt tggatga

26

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

cttgctcctcc aataagtcct ggctatcg

28

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

cgatagccag gacttattgg aggacaag

28

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

tatcgctgga tggcgctgcg gcgttttattc

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

aaaacgccgc agcgccatcc agcgatagcc

30

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

catcctgctg ctaccctca tcttcttg

28

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

caagaagatg agggctagca gcaggatg

28

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

atgttgcccg ttgcgcctct acttcca

27

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

tggaagtaga ggcgcaacgg gcaacat

27

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

agcacggggc cttcgaagac ctgcacgatt

30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 16

gtgcaggtct tcgaaggccc cgtgctggtg

30

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

ccatgcaaga cctcgacgat tcctgct

27

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

agcaggaatc gtcgaggctc tgcacgg

27

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19

atgtttccct ctagttgctg tacaa

25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 20

ttgtacagca actagaggga aacat

25

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21

tttccctctt gcagctgtac aaaac

25

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

ttttgtacag ctgcaagagg gaaac

25

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 23

cctcttgttg ctcgacaaaa ccttcg

26

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 24

cgaaggtttt gtcgagcaac aagagg

26

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 25

tcggacggaa acagcacttg tattcc

26

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 26

ggaataacaag tgctgtttcc gtccga

26

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 27

cggaaactgc acggccattc ccatccca

28

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 28

tgggatggga atggccgtgc agtttccg

28

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 29

accaattttc tttgcgcttt ggggtatac

28

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 30

gtatacccaa agcgcaaaga aaattggt

28

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 31

ccttcggacg gaaacagcac ggccattccc

30

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 32

gggaatggcc gtgctgtttc cgtccgaagg

30

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 33

tttcctctt gtagctcgac aaaac

25

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 34

gttttgtcga gctacaagag ggaaa

25

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 35

atgtttccct cttctagctc gacaa

25

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 36

ttgtcgagct agaagaggga aacat

25

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に係る中空ナノ粒子を構成する HB s A g L タンパク質であって、Cys 残基が置換される前の状態のタンパク質の概略模式図である。

【図 2】

本発明に係る中空ナノ粒子を構成する HB s A g S タンパク質であって、Cys 残基が置換される前の状態のタンパク質のアミノ酸配列を示す図である。

【図 3】

本発明に係る中空ナノ粒子を構成する HB s A g L タンパク質をコードする遺伝子プラスミドの作成方法を示した図である。

【図 4】

本発明に係る中空ナノ粒子を構成する HB s A g タンパク質の 1 次構造を直線で表した模式図であり、(a) は Cys 残基を 1 箇所置換した HB s A g タンパク質を、(b) は 2 ヶ所以上置換した HB s A g タンパク質を示している。

【図 5】

本発明に係る中空ナノ粒子の抗原性を野生型を 100 として算出した相対値として示した図面である。

【図 6】

本発明に係る HB s A g 粒子を還元条件((a)～(d))、または非還元条件((e)～(h))でウェスタンブロッティングした電気泳動写真を示す図面である。

【図 7】

本発明に係るHBsAg粒子を用いてHepG2細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を示す図面である。

【図 8】

本発明に係るHBsAg粒子であるBNP-Lm8を用いてHepG2細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を示す図面である。

【図 9】

本発明に係るHBsAg粒子であるBNP-Lm8を用いてHepG2細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を示す、図8を拡大した図面である。

【図 10】

本発明に係るHBsAg粒子であるBNP-Lm8を1週間4℃で保存したものを用いてHepG2細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を示す図面である。

【図 11】

本発明に係るHBsAg粒子であるBNP-Lm8を用いてHepG2細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を示す図面である。

【図 12】

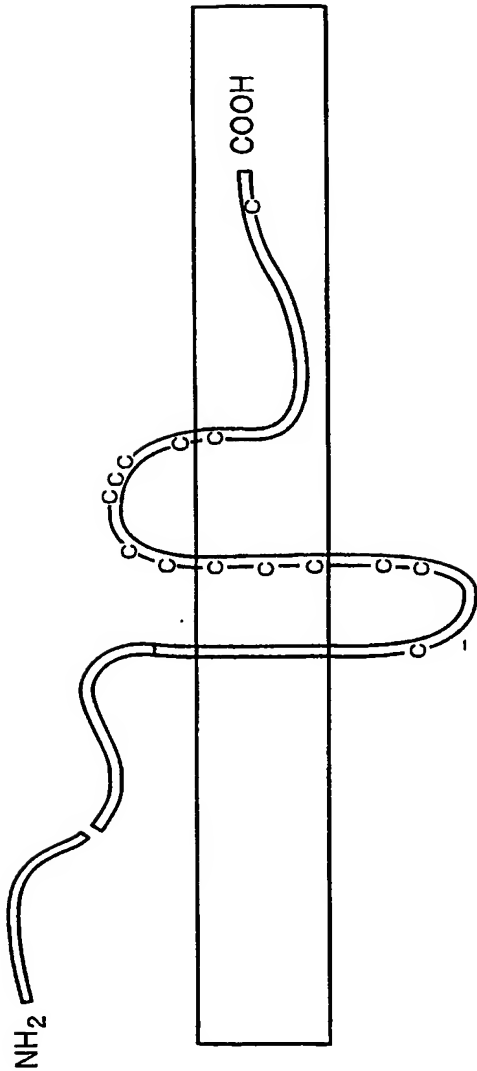
本発明に係るHBsAg粒子であるBNP-Lm8を用いてWiDr細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を示す図面である。

【図 13】

本発明に係るHBsAg粒子であるBNP-Lm8と、BNP-Lm7bとを用いてHepG2細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を比較した図面である。

【書類名】 図面

【図 1】



mrslilvlc flplaalgaV	ROGMGTNLSV	PNPLGFFPDH	QLDPAFGANS	NNPDWDFNP	60
secretion signal					
KDQWEANQV	GAGAFGGFT	PPHGGLGWS	POAQGILTV	PAAPPASTN	RQGRQPTPI 120
SPPLRDSHPQ	AMQNNSTTEH	QALLDPRVRG	LEFPAGGSSS	GTVPVPTTA	SPISGDPAPN 180
MENTTSGFLG	PLLVLQAGFF	LLTRILTIQ	SLDSWMTSLN	FLGAPTCPG	QNSQSPTSNH 240
* *	*	*	*	*	
SPTSCPPICR	GYRWCLRRF	IIFLFIILLC	LIFLLVLDY	QGMPLVCPLL	PGTSTSTGP 300
* *	***	*	*	*	
CKTCTIPAQG	TSMFPSCCCT	KPSDGNCTCI	PIPSSWAFAR	FLNEWASVRF	SWLSLLVPFV 360
QWFVGLSPTV	WLSVIWMWY	WGPSLYNLS	PFLPLLPFF	CIWVVI	406

【図 2】

Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys
48

Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser

Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65 69 76

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
90

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly
107

Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala
121 124

Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
137 138 139

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg
147 149

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu

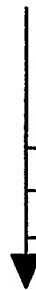
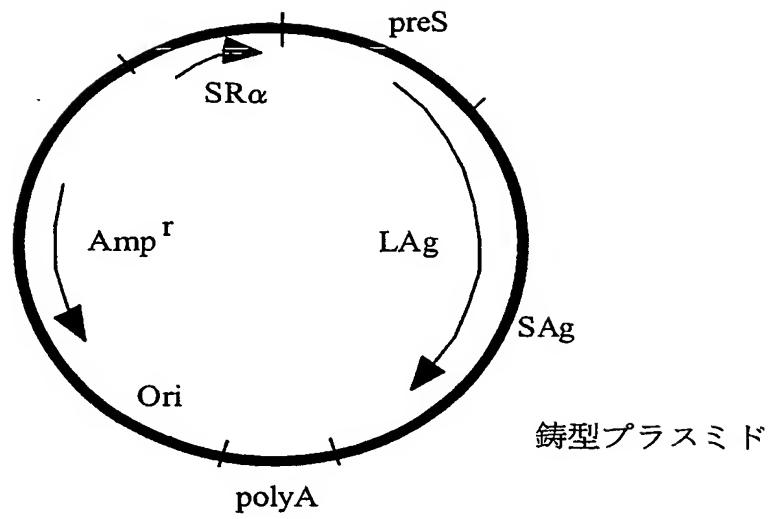
Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu

Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile

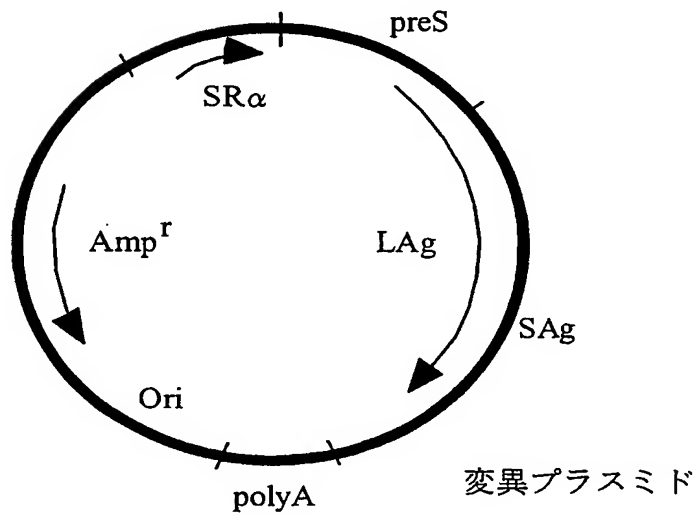
Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
221

Tyr Ile
226

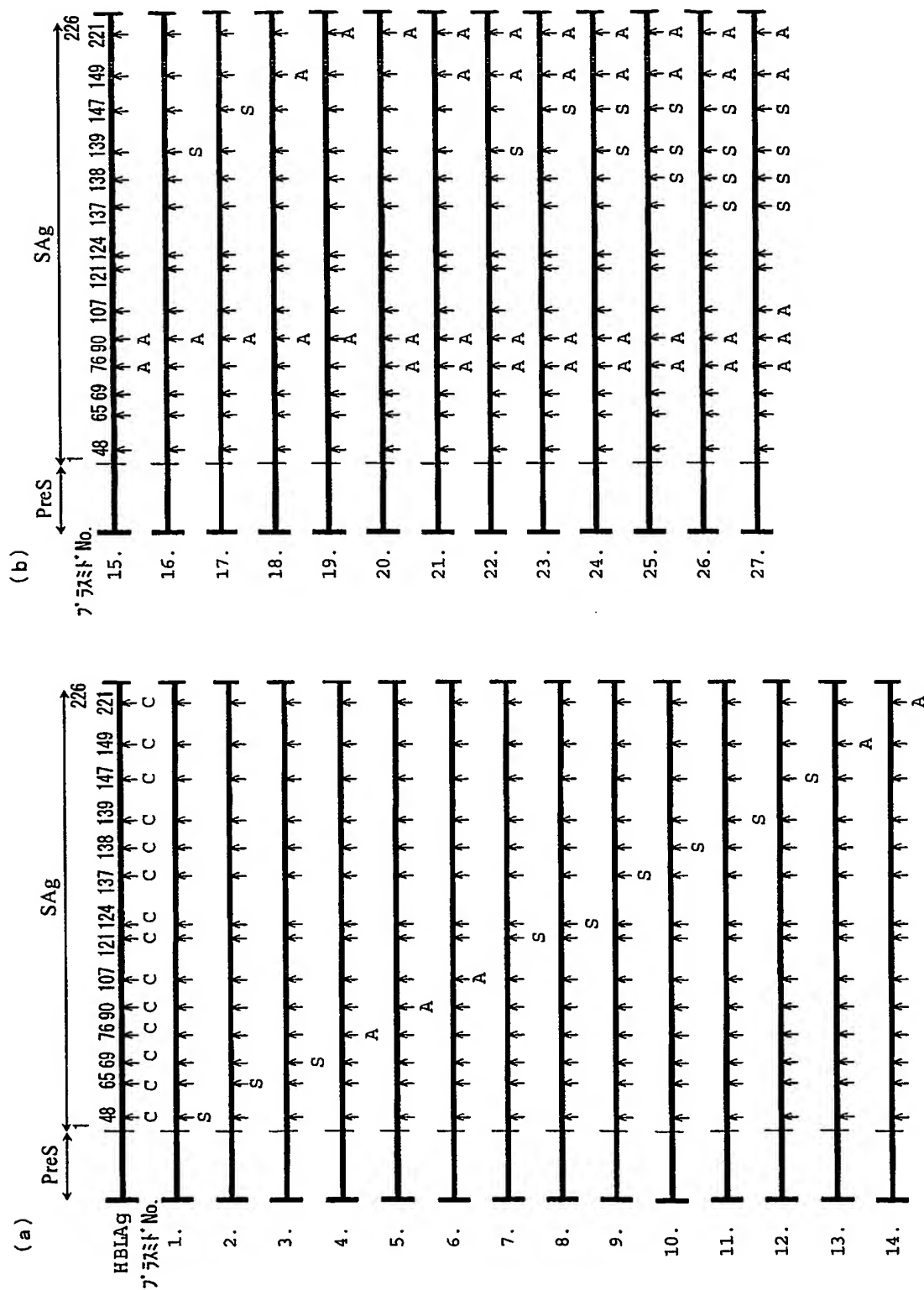
【図 3】



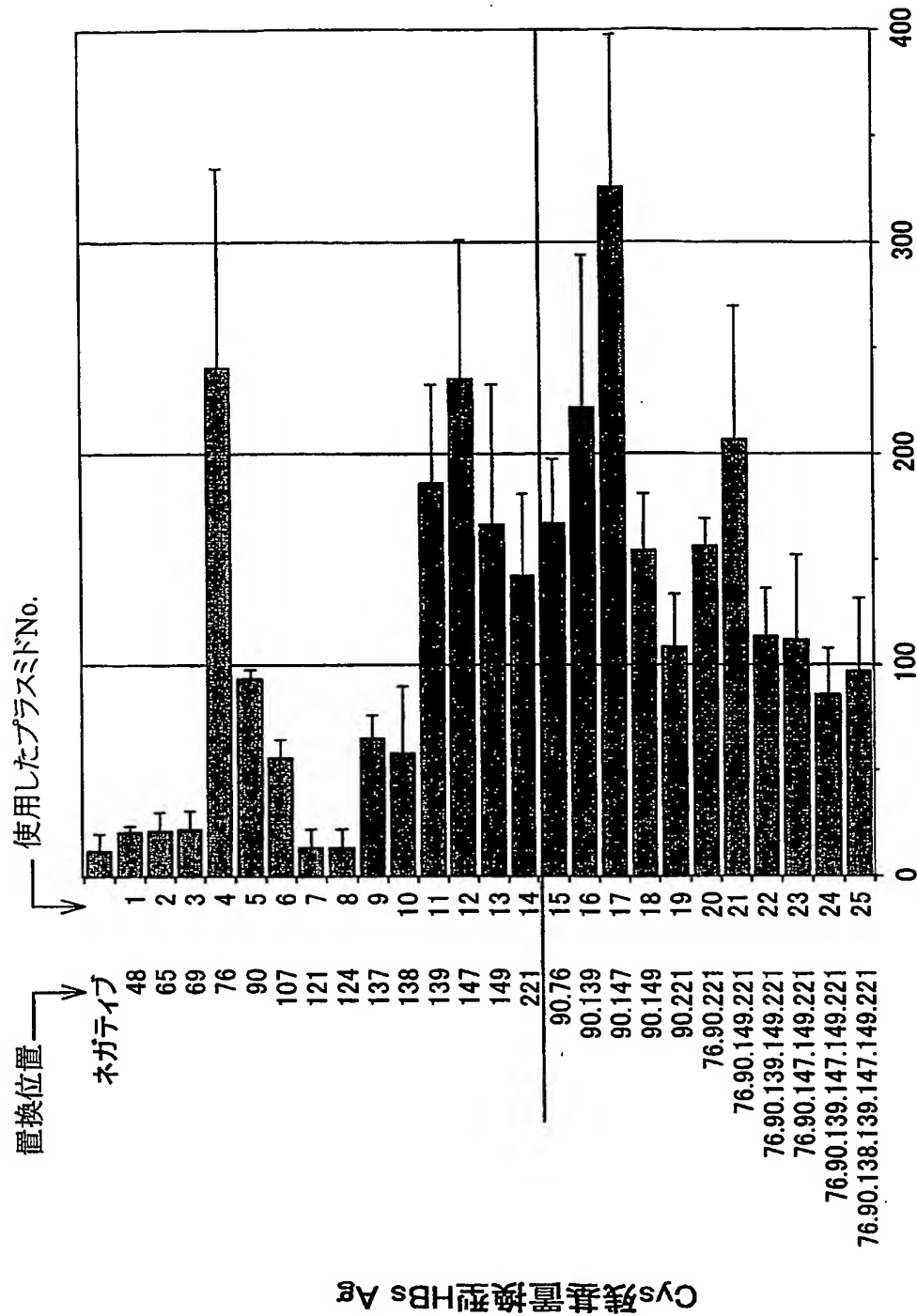
変異導入プライマーによるPCR
制限酵素DpnI消化
大腸菌形質転換



【図 4】

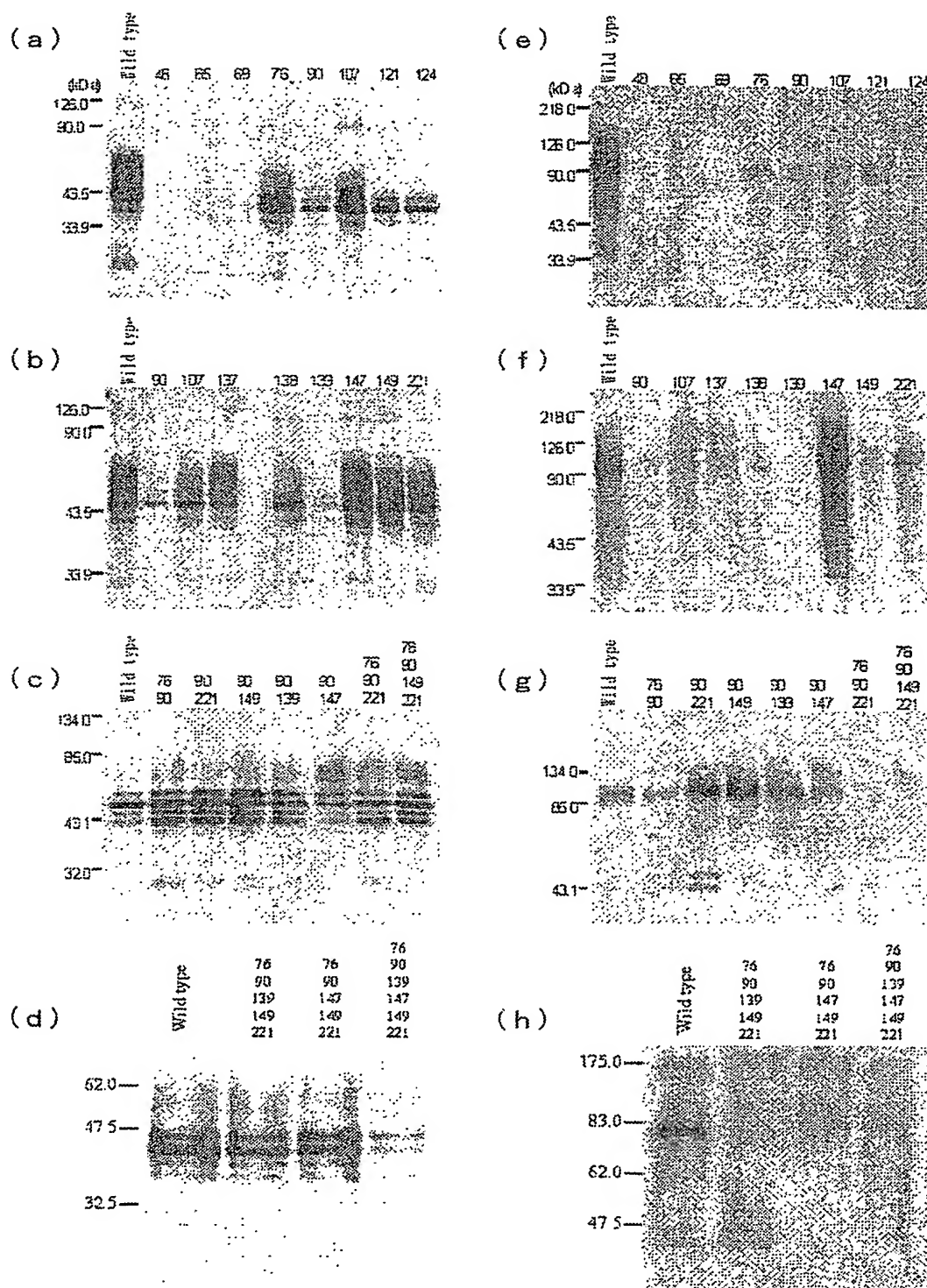


【図 5】



HBs Ag野生型を100としたときの粒子抗原性の相対値 (%)

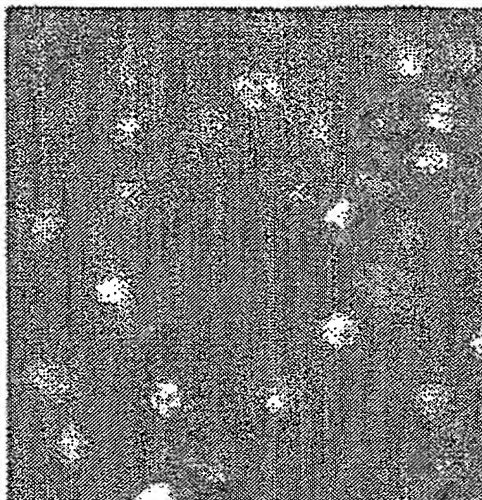
【図 6】



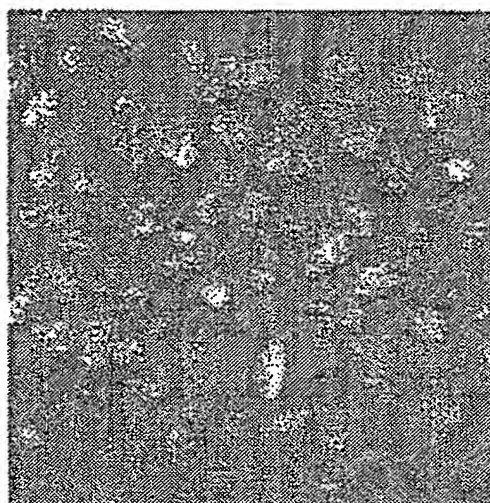
BEST AVAILABLE COPY

【図 7】

(b)

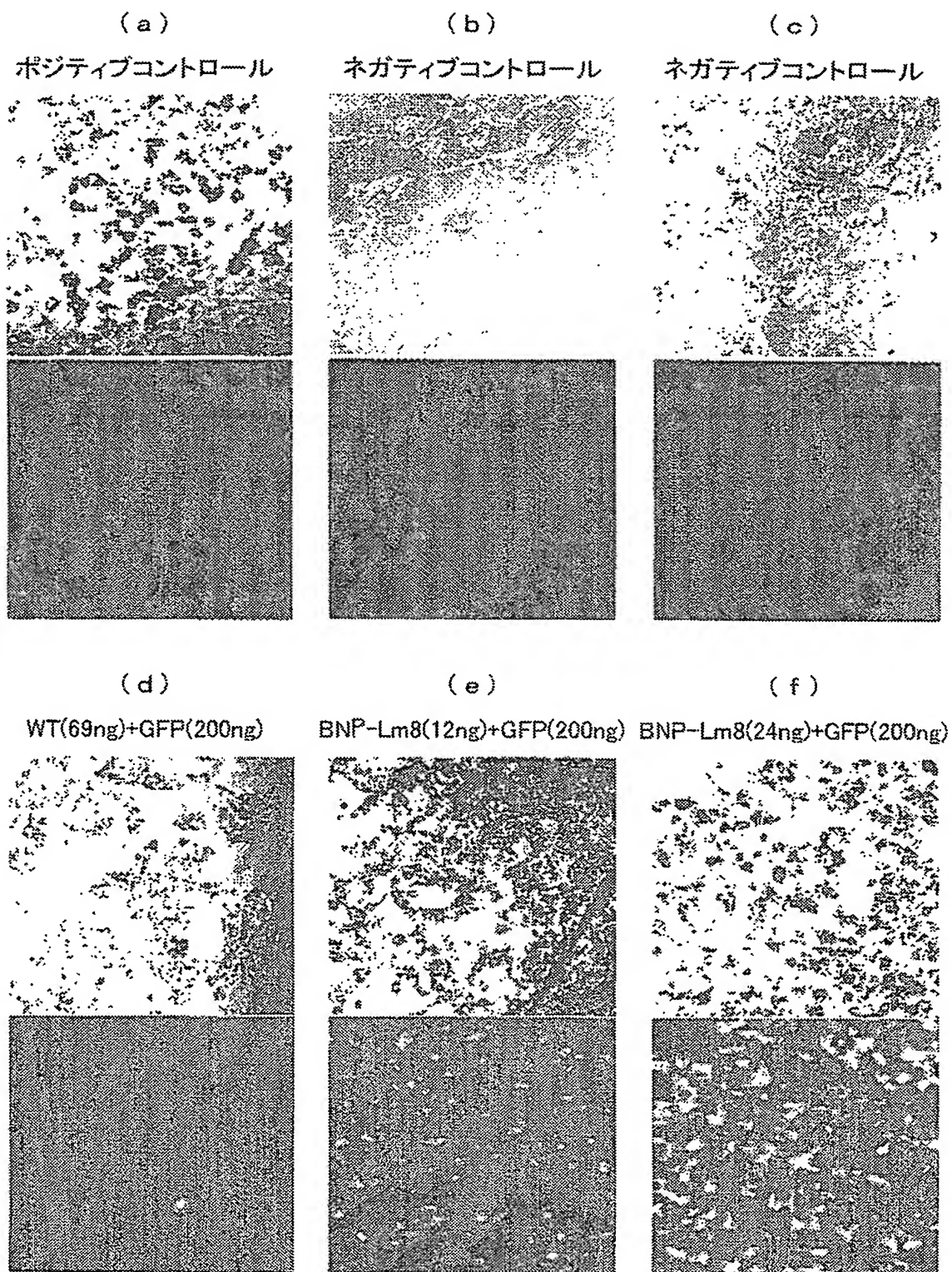


(a)



BEST AVAILABLE COPY

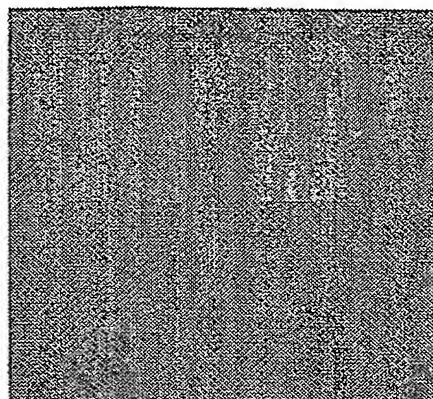
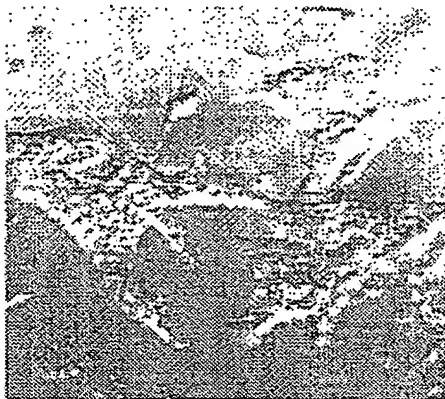
【図 8】



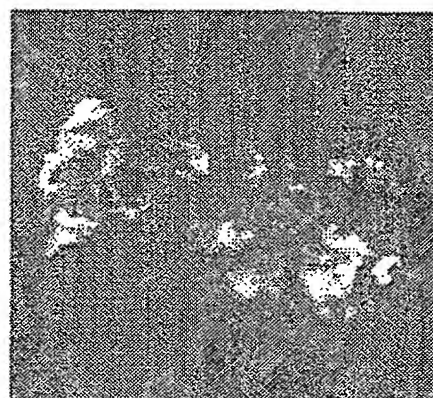
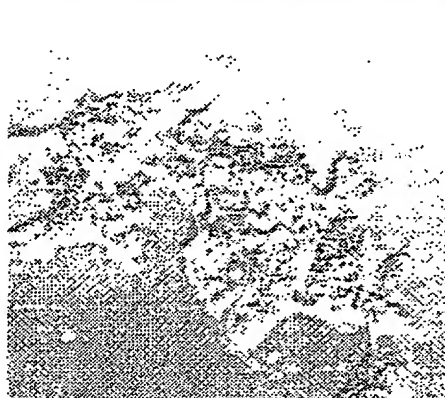
BEST AVAILABLE COPY

【図 9】

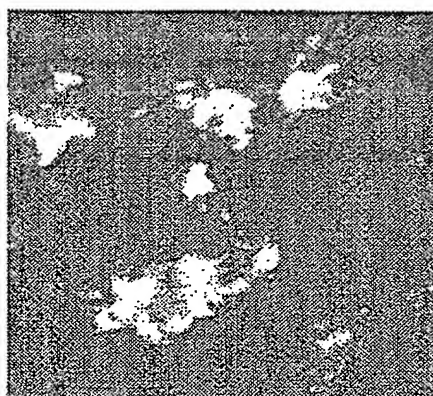
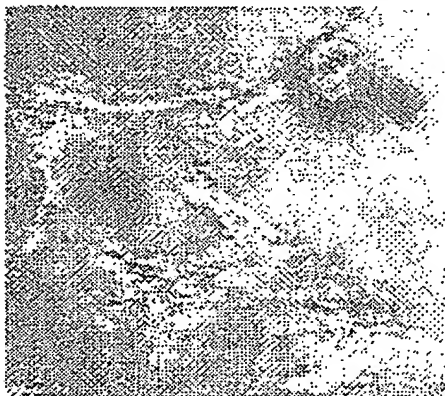
(a) ポジティブコントロール



(b) BNP-LM8(12ng)+GFP(100ng)



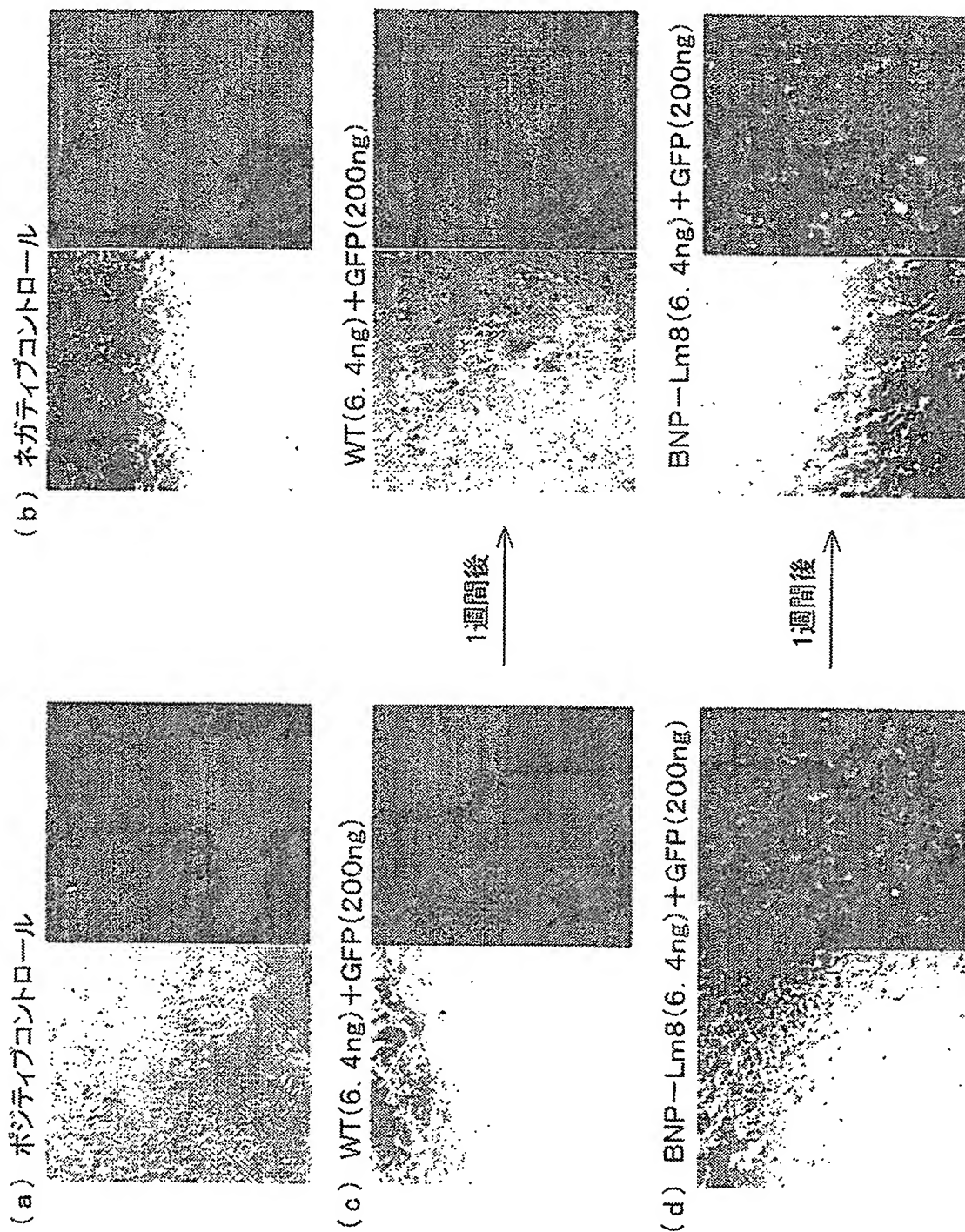
(c) BNP-Lm8(24ng)+GFP(200ng)



BEST AVAILABLE COPY

出証特 2003-3062770

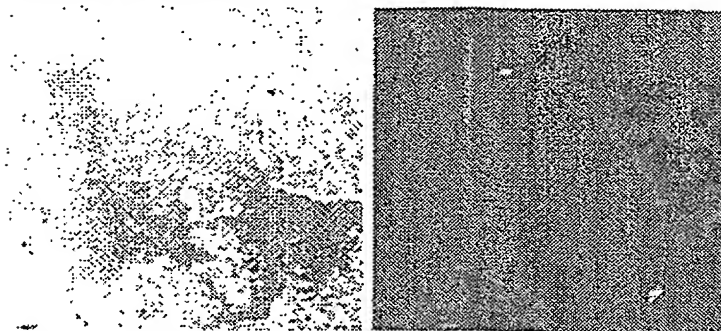
【図 10】



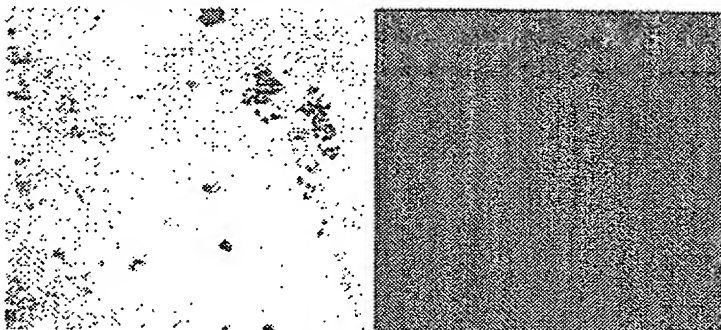
BEST AVAILABLE COPY

【図11】

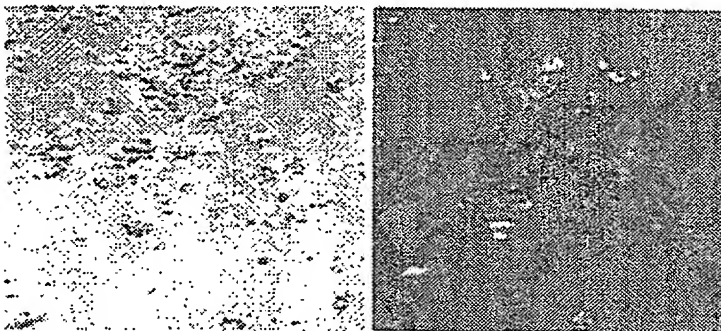
(a) ポジティブコントロール



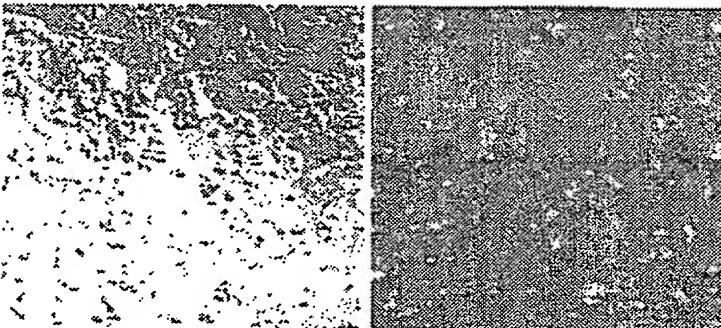
(b) ネガティブコントロール



(c) WT(14ng)+GFP(200ng)



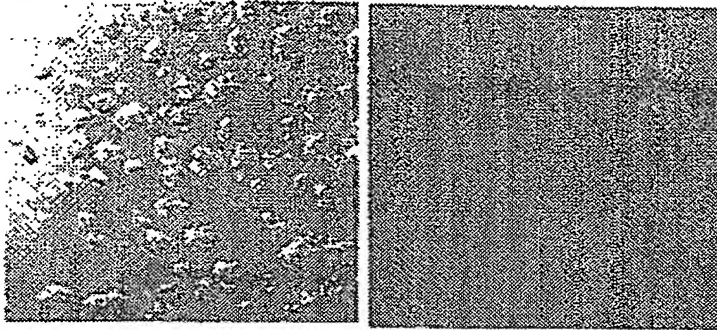
(d) BNP-Lm8(5ng)+GFP(200ng)



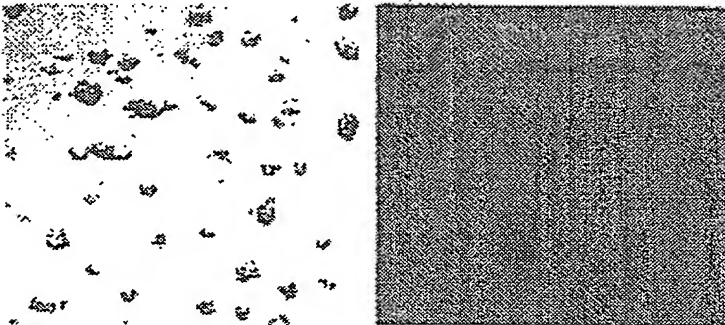
BEST AVAILABLE COPY

【図 12】

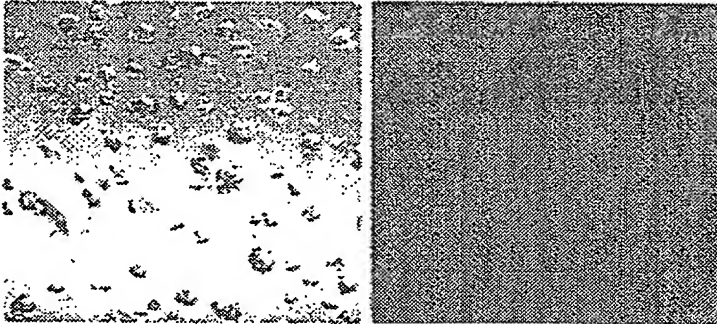
(a) ポジティブコントロール



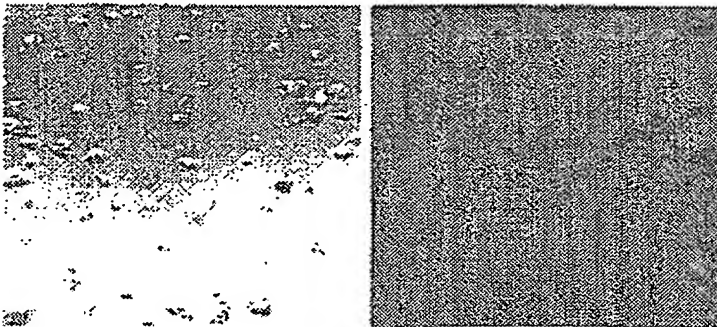
(b) ネガティブコントロール



(c) WT(14ng)+GFP(200ng)



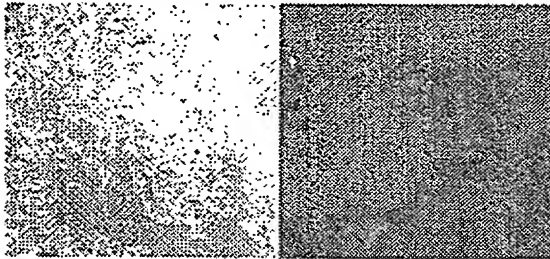
(d) BNP-Lm8(5ng)+GFP(200ng)



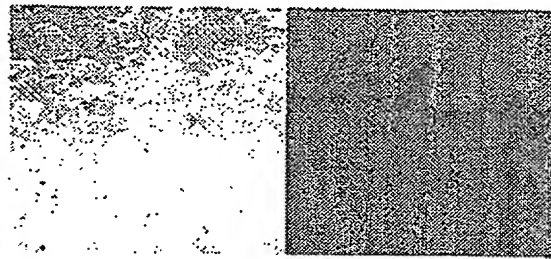
BEST AVAILABLE COPY

【図 13】

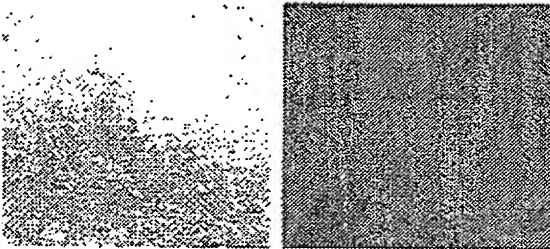
(a) ポジティブコントロール



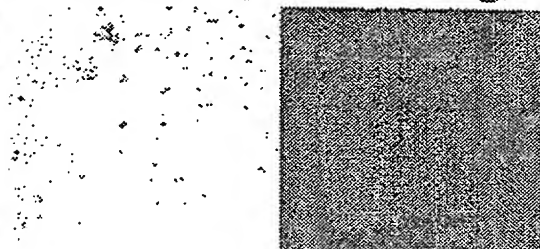
(b) ネガティブコントロール



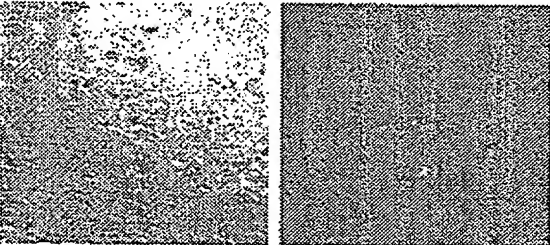
(c) WT(3.2ng)+GFP(200ng)



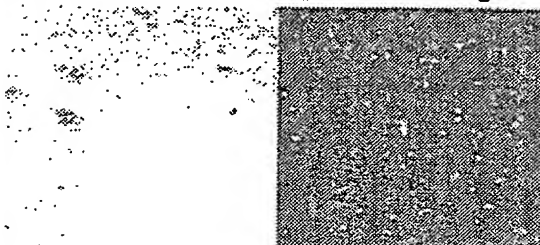
(d) WT(6.4ng)+GFP(200ng)



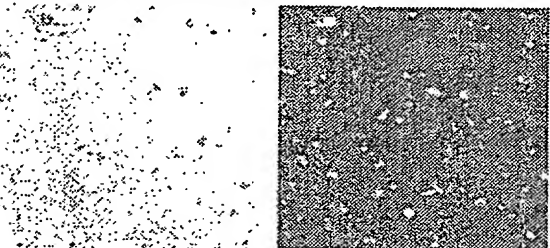
(e) BNP-Lm7b(3.2ng)+GFP(200ng)



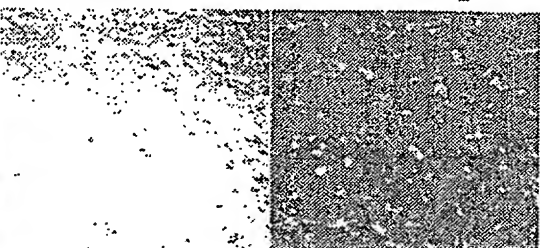
(f) BNP-Lm7b(6.4ng)+GFP(200ng)



(g) BNP-Lm8(3.2ng)+GFP(200ng)



(h) BNP-Lm8(6.4ng)+GFP(200ng)



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 目的の細胞や組織に特異的に物質を導入する中空ナノ粒子であって、粒子構造を安定化し、効率よく物質導入することができる中空ナノ粒子、およびこれを用いた薬剤を提供する。

【解決手段】 肝細胞などの特定の細胞に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質（例えば、B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質）からなる中空ナノ粒子において、当該タンパク質のシステイン残基を他のアミノ酸に置換した中空ナノ粒子である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-183863
受付番号	50301072517
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 7月 2日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	396020800
【住所又は居所】	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
【氏名又は名称】	科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】	100080034
【住所又は居所】	大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和 南森町ビル 原謙三国際特許事務所
【氏名又は名称】	原 謙三

特願 2003-183863

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団